

**AEREMONIUM CHRYSOGENUM LIA-7-049 STRAIN AS ACID PROTEINASE
PRODUCENT**

Patent number: SU779383
Publication date: 1980-11-15
Inventor: GRINBERG GRIGORIJ E; KUZNETSOVA OLGA S;
KONEV YURIJ E; KAMYSHKO OLGA P; GALYNKIN
VALERIJ A; KLIKH SERAFIMA F
Applicant: VNI T I ANTIBIOTIKOV FERMENTOV (SU)
Classification:
- **international:** C12N15/00; C12D13/10
- **european:**
Application number: SU19792734475 19790122
Priority number(s): SU19792734475 19790122

Abstract not available for SU779383

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

AN 1981-54802D [30] WPIDS
TI **Acid proteinase** microbiological production - using
Acremonium chrysogenum strain as enzyme producer for
high proteolytic activity.

DC D13 D16

IN KAMYSHKO, O P; KONEV, Y U; KUZNETSOVA, O S

PA (ANTI-R) ANTIBIOTICS ENZYMES

CYC 1

PI SU 779383 B 19801115 (198130)*

PRAI SU 1979-2734475 19790122

AN 1981-54802D [30] WPIDS

AB SU 779383 B UPAB: 19930915

Microbiological production of **acid proteinase** enzyme with
milk- clotting activity includes submerged culturing of **Acremonium**
chrysogenum L1A-T-049 producer strain. The strain, described as
new is separated from local soil sample.

The acid proteinase biosynthesis is conducted in a culture medium
comprising (in weight%): corn extract 0.1; soya bean flour 2.0; ammonium
sulphate 0.2; glucose 2.0; starch 2; chalk 0.3 and water to 100 ml at pH
6.7-6.8. The above enzyme is non-toxic and when incubated with pepsin it
increases the proteolytic activity of pepsin. Milk clotting activity of
acid proteinase containing culture medium is 300 units/ml. Clotting period is
1.5 min. Bul.42/15.11.80.

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

патентно-техническая
библиотека МБА

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 22.01.79 (21) 2734475/28-13

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 15.11.80. Бюллетень № 42

Дата опубликования описания 15.11.80

(11) 779383

(51) М. Кл.³

С 12 D 13/10
С 12 N 15/00

(53) УДК 577.15
(088.8)

(72) Авторы
изобретения

О.С. Кузнецова, Ю.Е. Конев, О.П. Камышко, В.А. Галынкин,
Г.Е. Гринберг и С.Ф. Клих

(71) Заявитель

Всесоюзный научно-исследовательский технологический институт
антибиотиков и ферментов медицинского назначения

(54) ШТАММ *ACREMONIUM CHRYSOGENUM* ЛИА-Т-049 -
ПРОДУЦЕНТ КИСЛОЙ ПРОТЕИНАЗЫ

Изобретение относится к медицинской промышленности, в частности к микробиологическому синтезу ферментов.

Известен штамм *Acrcmonium chrysogenum* - продуцент кислой протеиназы, характеризующийся следующими морфолого-культуральными признаками [1].

Штамм образует простые конидиеносцы, прямостоящие, с гладкими стенками, бесцветные, 25-50 мкм длиной, 1,5-2,5 мкм в диаметре у основания и 0,6-1,2 мкм у вершины. Конидии в плотных слизистых головках эллипсоидные, бесцветные, с несколько уплотненным нижним концом, иногда слабо искривленным, с хрупкими гладкими стенками. Конидии у типового штамма имеют размеры 4,1-4,3 x 2,4-2,6 мкм, иногда до 1,6-1,8 мкм шириной. Типичные хламидоспоры отсутствуют. В старых культурах гифы распадаются на фрагменты, подобные артроспорам.

Спорообразование чаще весьма скудное. Усиление споруляции можно достигнуть, применяя среды со стеблями люпина.

Колонии дрожжевидные, слизистые, тонко складчатые, хромо-желтые или

тонко пушистые, сухие, бледно-желтые. На 10-й день колонии достигают 8-15 мм в диаметре. Обратная сторона колоний и агар окрашены в интенсивный хромо-желтый цвет. Наиболее интенсивный рост наблюдается в кислом вишневом агаре.

Недостаток штамма - недостаточно высокая активность фермента.

Цель изобретения - выявление штамма, способного синтезировать кислую протеиназу с молокосвертывающей активностью.

Штамм *Acrcmonium chrysogenum* ЛИА-Т-049 выделен из почвенного образца № 8520 Ленинградской области.

Штамм *Acrcmonium chrysogenum* - продуцент кислой протеиназы.

Хранится в коллекции Всесоюзного научно-исследовательского технологического института антибиотиков и ферментов медицинского назначения под номером ЛИА-Т-049. Морфологические признаки. Культура *Acrcmonium chrysogenum* ЛИА-Т-049 образует неразветвленные неспитированные конидиеносцы, в виде боковых прямостоящих веточек до 30-90 x 2,0 мкм. Конидии эллипсоидные, одноклеточные, бесцветные, 3-4,5 x 1,5 мкм,

собраны в плотных слизистых головках шириной 4,5-9 мкм, длиной 6 мкм. Типичные хламидоспоры отсутствуют. Гифы тонкие, слабо септированные, ветвящиеся, 1,5 мкм толщиной. В старых культурах гифы распадаются на фрагменты, подобные артростпорам.

Спорообразование чаще скудное.

Культуральные признаки. Агар Чапека с глюкозой. Колонии светло-бежевые, на 8-й день достигают 6 мм в диаметре, складчатые, сухие. Воздушный мицелий беловатый, пушистый. Растворимый пигмент отсутствует. Сусло-агар. Колонии бледно-желтые, сухие, складчатые, достигают 10-12 мм в диаметре на 8-10-й день. Воздушный мицелий белый, пушистый. Растворимый пигмент отсутствует. Среда не окрашена. Картофельный агар. Колонии светло-бежевые, сухие, тонко-складчатые, 9-10 мм в диаметре, с пыльным, белесым мицелием. Растворимый пигмент отсутствует. Агар не окрашен.

Кукурузный агар. Колонии желтоватые, сухие. На 8-10-й день колонии достигают 12-14 мм в диаметре. Воздушный мицелий беловатый, пушистый. Среда не окрашена.

Органическая среда с переваром Хоттингера. Колонии светло-бежевые, 6-8 мм в диаметре. Воздушный мицелий беловатый, слегка пушистый. Растворимый пигмент отсутствует. Крахмало-аммиачный агар. Колонии светло-бежевые, сухие, складчатые до 6 мм в диаметре на 8-й день роста. Воздушный мицелий белесый, пушистый. Растворимый пигмент отсутствует.

Физиолого-биохимические признаки. Усваивает как органический, так и неорганический азот. Оптимальная температура роста 23-25°C. Развитие культуры лучше при pH 6,0-6,5. В качестве единственных источников углерода и энергии используют глюкозу, сахарозу, крахмал, арабинозу, ксилозу, мальтозу, маннит, инозит, не усваивает фруктозу, рамнозу, галактозу. Хорошо разжижает желатину, молоко коагулирует и пептонизирует, крахмал гидролизует, растет на клетчатке. Антимикробных свойств штамм не проявляет.

Культура хранится на агаре Чапека или в лиофильно высушенном виде.

При глубинной ферментации штамм *Acremonium chrysogenum* ЛИА-Т-049 выделяет культуральную жидкость кислой протеиназы молокосвертывающего действия. Биосинтез кислой протеиназы проводили на качалке (220 об/мин) при температуре 23-24°C в течение 5 сут. в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл со 100 мл среды следующего состава, вес. %: кукурузный экстракт 0,1 (по общему

азоту); соевая мука 2,0; сернокислый аммоний 0,2; глюкоза 2,0; крахмал 2; мел 0,3; pH до стерилизации 6,7-6,8.

По окончании ферментации протеолитическая активность культуральной жидкости при pH 4,0-5,0 составляла 2,0-1,2 ПЕ/мл. Молокосвертывающая активность культуральной жидкости 200-300 ЕД/мл. Время створаживания молока 1,5-2,0 мин.

Для выделения кислой протеиназы культуральную жидкость центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 мин при 10-12°C.

Осадок отбрасывали, к нативному раствору добавляли сульфат аммония (0,6% насыщения) при 4-6°C, жидкость оставляли в холодной камере на 18 ч. Затем осадок отделяли и растворяли в дистиллированной воде. Полученный раствор концентрировали с помощью ультрафильтрационной установки, затем подвергали диализу и лиофильной сушке.

Изучение препарата кислой протеиназы показало, что он обладает протеолитической активностью в кислой области pH 4-5 (0,6-0,7 ПЕ/мг), а при совместном инкубировании с пепсином потенцирует протеолитическую активность последнего.

Пример. Проведено испытание штамма *Acremonium chrysogenum* ЛИА-Т-049 при глубинной ферментации в колбах Эрленмейера емкостью 750 мл на качалках (n=220 об/мин) при температуре 23-24°C. Для хранения культуры и приготовления посевных партий была использована агаризованная среда следующего состава, %: глюкоза 2,0, K_2HPO_4 0,1, $NaNO_3$ 0,3, KCl 0,05, $MgSO_4$ 0,05, $FeSO_4$ 0,0015, агар-агар 2,0, pH до стерилизации 6,7.

Выращивание проводили при 27°C в течение 21 сут. Ферментационная среда, %: кукурузный экстракт 0,1 (по общему азоту); соевая мука 2,0; сернокислый аммоний 0,2; глюкоза 2,0; крахмал 2,0; мел 0,3; pH до стерилизации 6,7-6,8. При куль-

тивировании указанного штамма в колбах, содержащих 100 мл ферментационной среды, протеолитическая активность культуральной жидкости при pH 5,0 на 5-е сутки роста составляла 2 ОПЕ/мл. Молокосвертывающая актив-

ность культуральной жидкости 300 ЕД/мл. Время створаживания молока 1,5 мин.

Проведенные фармакологические исследования показали, что препарат кислой протеиназы не токсичен при введении внутрь и мало токсичен при внутрибрюшинном и внутривенном введении. Пероральное введение препарата мышам в дозах до 5000 мг/кг не вызывало гибели животных.

Формула изобретения

Штамм *Ascremonium chrysogenum* ЛИА-Т-049 - продуцент кислой протеиназы.

Хранится в коллекции Всесоюзного научно-исследовательского технологического института антибиотиков и ферментов медицинского назначения под номером ЛИА-Т-049.

Морфологические признаки. Культура образует неразветвленные несептированные конидиеносцы в виде боковых прямостоящих веточек до 30-90 x 2,0 мкм. Конидии эллипсоидные, одноклеточные, бесцветные, размером 3,0-4,5 x 1,5 мкм, собраны в плотные слизистые головки шириной 4,5-9 мкм, длиной 6 мкм.

Типичные хламидоспоры отсутствуют. Гифы тонкие, слабо септированные, ветвящиеся, 1,5 мкм толщиной, в старых культурах распадаются на фрагменты, подобные артроспорам. Спорообразование чаще скудное.

Культуральные признаки. Агар Чапека с глюкозой. Колонии светло-бежевые, на 8-й день роста достигают 6 мм в диаметре складчатые, сухие. Воздушный мицелий беловатый, пушистый. Растворимый пигмент отсутствует.

Сусло-агар. Колонии бледно-желтые, сухие, складчатые, достигают 10-12 мм в диаметре на 8-10-й день. Воздушный мицелий белый, пушистый. Растворимый пигмент отсутствует. Среда не окрашена.

Картофельный агар. Колонии светло-бежевые, сухие, тонкоскладчатые, 9-10 мм в диаметре, с пыльным

белесым мицелием. Растворимый пигмент отсутствует. Агар не окрашен.

Кукурузный агар. Колонии желтоватые, сухие, на 8-10-й день колонии достигают 12-14 мм в диаметре. Воздушный мицелий беловатый, пушистый. Среда не окрашена.

Органическая среда с переваром Хоттингера. Колонии светло-бежевые, 6-8 мм в диаметре. Воздушный мицелий беловатый, слегка пушистый. Растворимый пигмент отсутствует.

Крахмало-аммиачный агар. Колонии светло-бежевые, сухие, складчатые, до 6 мм в диаметре на 8-й день роста. Воздушный мицелий белесый, пушистый. Растворимый пигмент отсутствует.

Физиолого-биохимические признаки. Усваивает как органический, так и неорганический азот. Оптимальная температура для роста 23-25°C. Оптимум pH 6,0-6,5. В качестве единственных источников углерода и энергии использует глюкозу, сахарозу, крахмал, арабинозу, ксилозу, мальтозу, маннит, инозит.

Не усваивает фруктозу, рамнозу, галактозу.

Хорошо разжижает желатину, молоко коагулирует и пептонизирует, крахмал гидролизует, растет на клетчатке. Антимикробных свойств штамм не проявляет.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе
1. Walter Gams *Cephalosporium-arfige* Ichimmespiizzo (*Hyphomycetes*), Jena, 1971, p. 109 (прототип).

Составитель И. Привалова

Редактор Н. Потапова

Техред М. Рейвес

Корректор С. Шекмар

Заказ 9294/3

Тираж 522

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР
по делам изобретений и открытий
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4